

Artigo de Revisão Bibliográfica

ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS NAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS

António Luís dos Santos Lamas

Mestrado Integrado em Medicina

Orientador: Dra. Maria Luciana Gomes Pinho, HSA/CHP

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Porto, 2015

Agradecimentos

À Olívia, pelo incansável e infindável afeto, pelo apoio incondicional e por ser constante imutável num mar de variáveis e mudanças inevitáveis, ao longo desta jornada.

Ao meu Avô, pelos inabaláveis valores e espírito humanista, pedras basilares no meu processo formativo.

Aos meus Pais, pelo apoio e presença nos bons e nos maus momentos.

Ao Marcelo e à Ana, pela amizade, apoio e companheirismo.

À Dra. Luciana, não apenas pela orientação, mas também pela paciência e disponibilidade.

Índice

Resumo	3
Abstract	4
Introdução	5
Alterações Genéticas e Epigenéticas nas Neoplasias Mieloproliferativas	7
<i>Mutações da via JAK-STAT</i>	7
<i>Mutações da Calreticulina</i>	11
<i>Mutações nos Reguladores Negativos da via JAK-STAT</i>	13
<i>Mutações nos Reguladores Epigenéticos</i>	15
<i>Mutações em Fatores de Transcrição</i>	18
<i>Correlações Genótipo-Fenótipo e Evolução Clonal</i>	19
Conclusão	25
Referências Bibliográficas	27

Resumo

As neoplasias mieloproliferativas são um grupo heterogêneo de patologias caracterizadas pela proliferação aberrante de células mielóides diferenciadas com origem clonal numa célula precursora hematopoiética e incluem as neoplasias mieloproliferativas clássicas BCR-ABL-negativas (policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária). Estas são patologias com diversas características em comum, com manifestações clínicas semelhantes, por vezes sobreponíveis, com progressão para mielofibrose primária a partir de policitemia vera e trombocitemia essencial, e com a possibilidade de transformação para leucemia mielóide aguda pós-neoplasia mieloproliferativa. A identificação da mutação JAK2V617F revelou importantes detalhes da sua base patológica e abriu o caminho à identificação de outras mutações, demonstrando que a desregulação das vias de sinalização intracelular ocupa um papel central na patogénese, com o envolvimento da via JAK-STAT em destaque. Além da sua sistematização em mutações da via JAK-STAT, da calreticulina, dos reguladores negativos da via JAK-STAT, dos reguladores epigenéticos e dos fatores de transcrição, as mutações podem ainda ser organizadas em mutações *driver*, determinantes do fenótipo, de que são exemplos a JAK2V617F, a MPLW515 ou a CALR, e *non-driver*, associadas à progressão da doença e ao seu prognóstico, como a TET2, a ASXL, a EZH2, entre outras. A carga alélica mutacional, o envolvimento diferencial das vias de sinalização celular, o *background* genético existente e o tipo de células precursoras hematopoiéticas envolvidas, bem como a ordem de aquisição das mutações, poderão influenciar as correlações genótipo-fenótipo. Estes fatores poderão ter influência na evolução clonal das neoplasias mieloproliferativas, base da instalação e progressão da doença, e elemento-chave à sua compreensão.

Palavras-Chave

Neoplasias mieloproliferativas, policitemia vera, mielofibrose primária, trombocitemia essencial, JAK2V617F, MPL, CALR, TET2.

Abstract

Myeloproliferative neoplasms are a heterogeneous group of diseases characterized by aberrant proliferation of differentiated myeloid cells, clonally derived from a hematopoietic precursor cell. It includes the classic BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis, which share several traits, such as similar, sometimes overlapping, clinical features, progression to myelofibrosis from polycythemia vera and essential thrombocythemia, and the possibility of transformation to post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemia. The identification of the mutation JAK2V617F revealed important details on their pathogenic basis and was followed by the discovery of many other mutations, exposing that the dysfunction of intracellular signalling pathways, namely the JAK-STAT pathway, is central to the pathogenesis. The genetic events can be divided into mutations that affect the JAK-STAT pathway, calreticulin, negative regulators of the JAK-STAT pathway, epigenetic regulators and transcription factors. They can also be classified as driver mutations, phenotype determinants, such as JAK2V617F, MPLW515 or CALR, or non-driver mutations, associated with disease progression and prognostic, such as TET2, ASXL, EZH2, among others. Mutant allele burden, the differential involvement of intracellular signalling pathways, individual genetic background or the type of hematopoietic precursor cells involved, as well as the order of mutation acquisition, may influence genotype-phenotype correlations. These factors may effect on clonal evolution of myeloproliferative neoplasms, the basis for disease initiation and progression, and key-element to their understanding.

Keywords

Myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera, primary myelofibrosis, essential thrombocythemia, JAK2V617F, MPL, CALR, TET2.

Introdução

As neoplasias mieloproliferativas (MPN) são um grupo heterogéneo de patologias caracterizadas pela proliferação aberrante de células mielóides diferenciadas com origem clonal numa célula progenitora hematopoiética. Segundo a mais recente classificação da *World Health Organization* (WHO), este grupo inclui as quatro MPN's clássicas, policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (ET), mielofibrose primária (PMF) e leucemia mielóide crónica (CML). Engloba ainda a leucemia neutrofílica crónica, a leucemia eosinofílica crónica, a mastocitose sistémica e as neoplasias mieloproliferativas não-classificáveis (1,2). As MPN's podem ainda ser divididas quanto à presença do gene de fusão BCR-ABL, existindo, por um lado, MPN's BCR-ABL-positivas como a CML, e, por outro, MPN's BCR-ABL-negativas, nomeadamente, a PV, a ET e a PMF, objeto de estudo desta revisão.

As primeiras descrições destas patologias datam do século XIX, mas o conceito de doença mieloproliferativa foi introduzido por William Dameshek, em 1951, agrupando a CML, a ET, a PV e a PMF, descrevendo-as como patologias interrelacionadas e “manifestações variáveis da atividade proliferativa da medula óssea, talvez devido a um estímulo até agora desconhecido” (3). A primeira tentativa de classificação das MPN's foi da autoria do PVSG (*Polycythemia Vera Study Group*), tendo sido substituída pela classificação de tumores da WHO, cuja mais recente revisão, datada de 2008 é responsável pela introdução do termo neoplasia mieloproliferativa, substituindo doença mieloproliferativa crónica, com o objetivo de refletir a natureza neoplásica destas patologias (2,4).

A PV, a ET e a PMF são patologias com diversas características em comum, com manifestações clínicas semelhantes, por vezes sobreponíveis, com possibilidade de progressão da PV e da ET para PMF, e com a possibilidade de transformação para leucemia mielóide aguda pós-MPN (sAML). O estudo genético deve ser complementado pela realização de biópsia de medula óssea, importante para o diagnóstico diferencial entre as diferentes MPN's (4).

Na generalidade, a esperança média de vida dos doentes com MPN's é inferior à da população, sendo as sobrevidas médias de aproximadamente 20 anos para a ET, 14 anos para a PV e 6 anos para a PMF, sendo superiores em doentes com idade inferior a 60 anos (5). A taxa de transformação leucémica é de 2,3% aos 10 anos, de 5,5% aos 15 anos e de 7,9% aos 20 anos na PV, enquanto na ET é de 2,3% aos 15 anos, sendo a evolução fibrótica mais frequente que a transformação leucémica (6,7). Na PMF, a taxa de transformação leucémica

ocorre em até 35% aos 3 anos e em até 65% aos 5 anos (8). Os fatores que influenciam negativamente a sobrevida são, na PV e na ET, a idade avançada, a leucocitose, a trombose e alterações no cariótipo (para a PV) (7,9). Na PMF, são fatores de prognóstico adverso: idade superior a 65 anos, anemia, leucocitose marcada, presença de blastos em circulação, sintomas constitucionais, alterações no cariótipo, necessidade de transfusão e trombocitopenia. Estes fatores são contabilizados no *score* DIPSS *plus* (*Dynamic International Prognostic Scoring System*) para a PMF (10).

Os avanços ocorridos nos campos da genética e da hematologia, durante o século XX, permitiram um aprofundar contínuo do conhecimento destas patologias, através da identificação do cromossoma *Philadelphia* (11) e a sua caracterização citogenética (12) e molecular (BCR-ABL) (13,14). A demonstração da natureza clonal da CML (15) e, mais tarde, da PV (16), da PMF (17) e da ET (18) foram outros dos marcos importantes na evolução do conhecimento sobre as MPN's. No entanto, o conhecimento da sua base patológica teve o seu maior avanço com a identificação da mutação JAK2V617F, em 2005 (19–22). A identificação sucessiva de novas mutações envolvidas nas MPN's, como a MPL (23) e mais recentemente a CALR (24,25), aliada a avanços na área da epigenética, com a identificação de várias mutações envolvidas na desregulação dos mecanismos epigenéticos de modulação da expressão genética, como a TET2 (26), a DNMT3A (27,28) e a IDH1/2 (29,30), permitiu uma maior compreensão dos mecanismos subjacentes à patogénese das MPN's e à sua progressão.

Tendo em conta a expansão de investigação e de produção científica, no que à base genética das MPN's clássicas diz respeito, o objetivo da presente tese é descrever as alterações genéticas e epigenéticas mais importantes a estas associadas e o seu papel na patogénese e progressão da doença.

Alterações Genéticas e Epigenéticas nas Neoplasias Mieloproliferativas

As MPN's caracterizam-se pela desregulação das vias de sinalização intracelular e associam-se a mutações envolvidas em diversas vias celulares, nomeadamente a sinalização dos recetores das citocinas e a regulação da expressão genética, quer através de fatores de transcrição, quer através de reguladores epigenéticos.

Deste modo, as mutações envolvidas nas MPN's podem ser sistematizadas em mutações da via JAK-STAT, da calreticulina, dos reguladores negativos da via JAK-STAT, dos reguladores epigenéticos e dos fatores de transcrição.

Mutações da via JAK-STAT

O conhecimento da base molecular de outras MPN's caracterizadas pela existência de mutações conducentes à ativação constitutiva de proteínas tirosina cinases, como a LMC (proteína de fusão tirosina cinase BCR-ABL), ou outras neoplasias mielóides, orientou a pesquisa de alterações genéticas envolvidas na patogénese para este tipo de vias de transdução de sinal (19–22).

A existência de regiões genómicas com perda de heterozigotia associada a dissomia uniparental adquirida foi descrita por Kralovics *et al.* (31), mais frequentemente localizadas no cromossoma 9p (em 33% dos doentes com PV). O mapeamento genético da região envolvida permitiu a identificação de 19 genes, incluindo o locus JAK2. As propriedades autoestimulatórias endógenas das células das MPN's e a hipersensibilidade às citocinas aumentaram o interesse no estudo do contributo da JAK2 para a patogénese das MPN's (31).

Em 2005, investigação conduzida por quatro laboratórios independentes levaria à identificação da mutação JAK2V617F, presente na maioria dos doentes com MPN's BCR-ABL-negativas (19–22).

Tendo em conta a importância desta nova linha de investigação, tornou-se pertinente a pesquisa e análise mais aprofundada da estrutura e do funcionamento fisiológico desta proteína, para uma maior compreensão do seu papel nestas patologias.

A família de proteínas tirosina cinase JAK (*Janus kinase*) inclui 4 cinases (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2), que partilham regiões de homologia sequencial, JAK *homology* (JH1 a JH7), com diversos domínios funcionais. São constituídas por um domínio aminoterminal FERM (*four-point-one, ezrin, radixin and moesin*), seguido de um domínio SH2-like (Src *homology* 2) e de dois domínios com alto grau de homologia, localizados na terminação carboxil, JH1 (com atividade cinase) e JH2 (pseudocinase, cataliticamente inativo) (32). O

domínio JH2 funciona como região autoinibitória, frenando a atividade cinase de JH1 na ausência de citocinas, e facilitando a ativação da JAK, quando na conformação ativa dos recetores (32,33). O domínio FERM interage com os domínios JH1 e JH2, impedindo a ativação inapropriada da JAK2 (34). A função do domínio SH2-like parece não estar relacionada com a atividade de fosfotransferase ou com a ligação a resíduos de fosfotirosina, e a sua integridade parece ser necessária para a sinalização constitutiva da JAK2V617F e para a indução de um fenótipo de MPN (32,35,36).

A JAK2 desempenha um papel crítico na sinalização de diversas citocinas e hormonas hematopoiéticas, ligando-se a recetores homodiméricos, como o recetor da eritropoietina (Epo-R), o receptor da trombopoietina (MPL), o receptor do G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), entre outros; a recetores heterodiméricos como os do GM-CSF, interleucina-1 e interleucina-3; e ao recetor 2 do interferon γ (IFNGR2). A JAK2 é a única proteína desta família com a função de mediação da sinalização do Epo-R e do MLP (32,37).

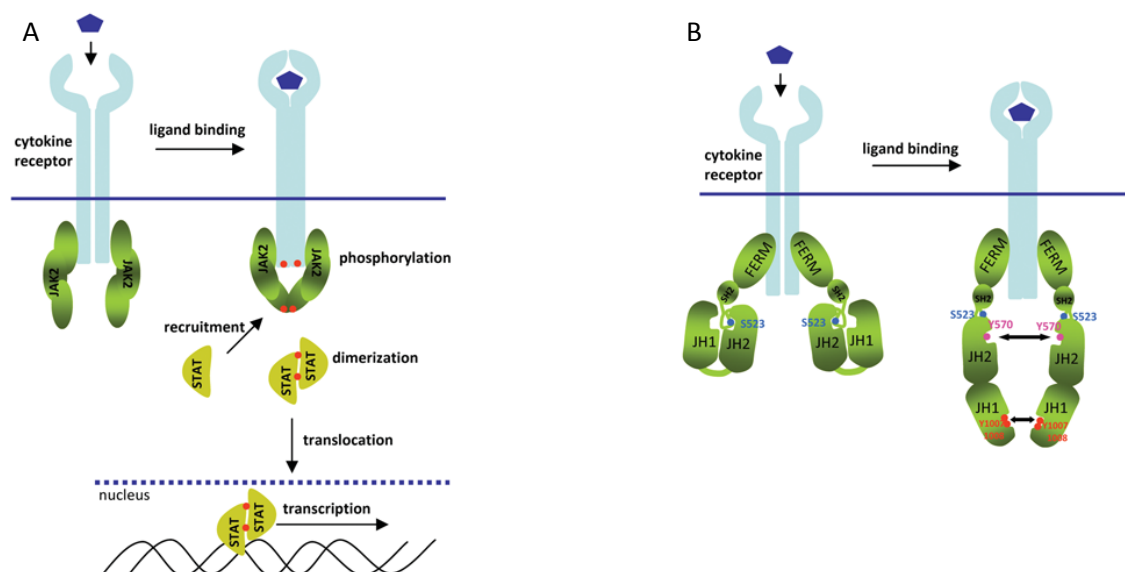


Figura 1 – A: estrutura e funcionamento da JAK2 na sinalização intracelular.

B: transfosforilação dos domínios funcionais JH1 e JH2.

Fonte: Silvennoinen et al. (32)

A ligação de citocinas ao domínio extracelular dos seus recetores provoca alterações conformacionais (Figura 1), que permitem a fosforilação de resíduos de tirosina nos domínios citoplasmáticos do recetor de citocinas e nas próprias JAK. A sua ativação e a criação de locais de ancoragem para proteínas de sinalização, como as proteínas STAT (*signal transducer and activators of transcription*), permitem a progressão da transdução de sinal e a ativação da transcrição de diversos genes-alvo, envolvidos numa grande variedade de processos celulares, incluindo a proliferação, diferenciação e apoptose (32,38).

A sua atividade é regulada por mecanismos de *feedback* negativo, como a JH2 e o FERM, pelas fosfatases da tirosina ou pelas proteínas SOCS (*Supressor Of Cytokine Signaling*), e pela fosforilação (32).

A JAK2 tem ainda função como regulador epigenético (39), através da fosforilação da histona H3Y41, impedindo-a de se ligar à HP1 α (*heterochromatin protein 1 α*). Este fenómeno influencia a estrutura da cromatina e modula a expressão de diversos genes (40). Exerce também esta função através da ligação à arginina metiltransferase PRMT5 e a sua fosforilação, ocorrendo com maior afinidade por intermédio da JAK2-mutada, comparativamente à *wild-type*. Esta interação conduz a uma diminuição da atividade da PRMT5, associada a promoção da mieloproliferação (aumento da formação de colónias e da diferenciação eritróide) (41).

Consistindo numa mutação *gain-of-function* do gene JAK2, localizado no cromossoma 9p24, a JAK2V617F resulta da troca de uma guanina por uma timina no nucleótido 1849, no exão 14, no cromossoma 9p, originando a substituição de uma valina por uma fenilalanina no codão 617, no domínio inibitório JH2 (19–22). Esta proteína mutada constitutivamente ativada é capaz de ativar vias de sinalização celular a jusante (JAK2-STAT5, ERK1/2, MAPK, PI3K/AKT e mTOR), de forma persistente, na ausência de ligação de citocinas (32,38).

Parece ser necessária a presença de um recetor homodimérico (Epo-R, MPL/Tpo-R ou G-CSF-R) para a sinalização constitutiva da JAK2V617F, o que poderá explicar a indução de proliferação celular nas três linhagens mielóides (42).

A mutação JAK2V617F ocorre em 95% dos doentes com PV, 50-60% dos doentes com ET e em 40-50% dos doentes com PMF, ocorrendo, ainda, em menos de 5% noutras neoplasias mielóides, podendo esta percentagem aumentar em doentes com síndromes de *overlap* mieloproliferativo/mielodisplásico (39,43).

A existência de uma pequena percentagem de doentes com PV na ausência da mutação JAK2V617F orientou a investigação para a possível existência de outras mutações na JAK2 e/ou noutros membros da família JAK e permitiu a identificação de diferentes mutações adquiridas no exão 12 (44), em doentes JAK2V617F-positivos ou negativos (45).

Estas mutações afetam a região adjacente ao início do domínio JH2 e são, na sua maioria, deleções. Os efeitos destas mutações estarão relacionados com a proximidade dos aminoácidos afetados ao domínio JH2, podendo interferir nas interações do domínio autoinibitório (45), no sentido da ativação constitutiva a níveis mais elevados do que com a

JAK2V617F e da promoção da proliferação celular independente de fatores de crescimento (44).

A homozigotia é relativamente rara nas mutações do exão 12, o que sugere diferenças quantitativas comparativamente à JAK2V617F: a heterozigotia para as mutações do exão 12 tem efeitos semelhantes à homozigotia para a JAK2V617F (45). As diferenças fenotípicas decorrentes desta mutação parecem estar associadas a uma eritrocitose predominante, com níveis de hemoglobina e hematócrito mais elevados, por oposição ao envolvimento das três linhagens, característico da PV (45).

A grande percentagem de doentes com ET ou PMF JAK2V617F-negativas orientou a investigação de outras proteínas envolvidas na sinalização intracelular, nomeadamente o recetor da trombopoietina. A proliferação e diferenciação de megacariócitos e o desenvolvimento das plaquetas são regulados pela trombopoietina que, ao ligar-se ao recetor MPL (Tpo-R ou CD110), causa a sua dimerização e ativa a via das tirosina cinases JAK2 e TYK2, ativando vias de sinalização intracelular, como STAT3, STAT5, ERK/MAPK, e PI3K/AKT (23).

O gene que codifica para o MPL localiza-se no cromossoma 1p34 (46), tendo sido descritas mutações *gain-of-function* no seu exão 10, ocorrendo em até 15% dos doentes com PMF ou ET, na ausência da mutação JAK2V617F (47). Originam frequentemente a substituição de um aminoácido triptofano no codão 515 (mutações MPLW515) por um outro aminoácido, levando à ativação espontânea do MPL (23,37,48). Este aminoácido localiza-se numa sequência (K/RWQFP) na porção justamembranar do MPL, responsável pela prevenção da ativação espontânea do recetor, desempenhando um papel major na conformação do MPL (49). A deleção desta sequência em modelos animais, associou-se a um fenótipo mieloproliferativo com mielofibrose (50). Defour *et al.* (51) descreveram, recentemente, a função específica do W515, importante para a modulação da ativação e dimerização do MPL.

Mutações da Calreticulina

A calreticulina é uma proteína *chaperone* do retículo endoplasmático que desempenha uma função essencial no *folding* de proteínas, além de outras funções nos domínios intra e extracelulares (52).

As suas funções são desempenhadas no lúmen do retículo endoplasmático (ER), noutros compartimentos celulares e no compartimento extracelular. No ER, por um lado, é responsável por assegurar o *folding* correto de proteínas, principalmente através do seu local de ligação à lectina e, por outro, por identificar e retirar do ER proteínas *misfolded*, com destino à degradação mediada pela ubiquitina. É ainda responsável pela regulação do metabolismo do cálcio através de vários mecanismos de sinalização celular, por meio de integrinas. Está também envolvida numa miríade de outros mecanismos fisiológicos e patológicos, que incluem o processamento e apresentação de antígenos, a fagocitose de células apoptóticas, a migração e adesão celular e a proliferação celular, entre outros (52).

Em 2013, Klampfl *et al.* (24) e Nangalia *et al.* (25) descreveram mutações no gene CALR, localizado no locus 19p13.3-p13.2, presentes em doentes com ET e PMF e ausentes em doentes com PV. Consistindo em inserções ou deleções, resultando em mutações do exão 9, que codifica a região carboxiterminal, estas mutações *frameshift* alteram a sequência de leitura um par de bases, sugerindo, este padrão estereotípico, uma forte pressão seletiva para a geração de mutações na região C-terminal (25). A substituição desta região implica a perda da sequência KDEL e do seu domínio de ligação ao cálcio. O domínio KDEL, presente também em algumas proteínas do ER permite a recolha da calreticulina e, consequentemente, esta poderá apresentar uma localização intracelular alterada. Deste modo, estas mutações afetam tanto a capacidade de ligação ao cálcio, como a capacidade de deslocação intracelular da calreticulina.

A presença destas mutações, *in vitro*, associa-se à proliferação independente de citocinas da linhagem megacariocítica, à hipersensibilidade à interleucina-3 e à demonstração do envolvimento da via JAK-STAT (24), estando presentes em células progenitoras multipotentes, capazes de gerar linhagens mielóides ou eritróides (25). Estas mutações são mutuamente exclusivas com as da JAK2 ou do MPL, sugerindo o seu envolvimento nas vias de sinalização celular (24,25).

Foram encontradas em 20-25% dos doentes com ET ou PMF, tornando-o o segundo gene mais frequentemente mutado nas MPN's (24,25). Considerando os doentes com ET ou PMF sem mutações na JAK2 ou no MPL, as mutações da calreticulina estarão presentes em

70 a 84% destes doentes (25). Ainda que inicialmente apenas descritas em doentes com ET e PMF, foram recentemente reportadas em doentes com PV e JAK2 *wild-type* (53).

Mutações nos Reguladores Negativos da via JAK-STAT

A via JAK-STAT desempenha um papel central na hematopoiese e na patogénese das MPN's, existindo diversos componentes que podem ser alvo de mutações, como os seus reguladores negativos.

LNK ou SH2B3 é um dos membros da família de proteínas adaptadoras SH2B (54) e regula negativamente a ativação da JAK2, através do seu domínio SH2, inibindo, deste modo, a sinalização através dos Epo-R e MPL (55). É ainda capaz de atenuar a sinalização induzida pelas mutações MPLW515L ou JAK2V617F (56) e a sua expressão aumentada na presença da JAK2V617F sugere um papel modulador no processo mieloproliferativo (57). A perda do LNK, em modelos animais, ainda que não resulte em crescimento independente de citocinas, poderá originar amplificação da sinalização e transformação induzida por outros oncogenes, como a mutação JAK2V617F, e por outras vias de sinalização dependentes da JAK2 ou de outros alvos do LNK (58). Takaki (59) descreveu, na ausência do LNK, a existência de expansão do *pool* de HSC's, com aumento da autorrenovação celular, presumivelmente pelo aumento da sinalização mediada pela Tpo e pelo seu recetor MPL através da STAT5 e da sua ação sobre proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-xL (55,60).

A ocorrência de mutações *loss-of-function* no exão 2 do gene LNK, em doentes com PMF e ET, na ausência de JAK2V617F resultam na perda completa ou incompleta da capacidade inibitória sobre a sinalização da Tpo (61). As mutações do LNK estão associadas à fase crónica das MPN's em menos de 5% dos doentes e podem surgir em fases tardias e associar-se à fase de transformação leucémica em até 10% dos doentes (62).

CBL (*Casitas B-cell lymphoma*) é uma família de proteínas homólogas (c-CBL, CBL-b e CBL-c) que desempenham funções de regulação negativa da sinalização intracelular, através da atividade de ligase da ubiquitina. São também proteínas adaptadoras multifunções, com efeito positivo na sinalização intracelular, através da ligação a tirosina cinases ativadas e do recrutamento de componentes de transdução de sinal, como o PI3K. A atividade de ligase da ubiquitina é desempenhada através do bloqueio competitivo da sinalização e da indução da degradação proteossómica do recetor, por intermédio da sua ubiquitinação (63).

A CBL poderá possuir outros alvos, como a JAK2 ou o MPL, tendo Saur *et al.* (64) demonstrado a ação da c-CBL na ubiquitinação da MPL. Após estimulação pela Tpo, ocorre ativação da c-CBL, que irá sinalizar o MPL para degradação. A ausência de c-CBL, em modelos animais, origina, em HSC's, hiperproliferação e hipersensibilidade à Tpo, além de

níveis elevados de fosforilação da STAT5, determinando uma função reguladora no desenvolvimento e propriedades funcionais das HSC's (65).

Ainda que mais comuns nas leucemias mielomonocítica crónica e juvenil, as mutações no gene C-CBL, localizado no cromossoma 11q23.3, foram descritas em 6% dos doentes com PMF. Estão frequentemente associadas a dissomia uniparental adquirida e originam disfunção do domínio RING, importante para a transferência de moléculas de ubiquitina (66–68). A esta disfunção associa-se um efeito dominante-negativo pela inibição da ação de outras isoformas *wild-type* da CBL, originando ativação prolongada das vias de transdução de sinal, após a estimulação por citocinas, e hipersensibilidade a diversos fatores de crescimento (67,69). É, por isso, simultaneamente considerado um gene supressor tumoral (se *wild-type*, dada a sua regulação negativa dos recetores tirosina cinase/MPL) e um proto-oncogene (se mutado).

As proteínas SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) desempenham regulação negativa da sinalização JAK, ou pela supressão da sinalização intracelular pela ligação e inibição da atividade das JAK, ou pelo bloqueio competitivo de locais fosforilados nos retores, ou através da degradação mediada pela ubiquitina (70). O seu envolvimento na patogénese das MPN's prende-se com o silenciamento dos seus genes por hipermetilação. A expressão deficiente de SOCS-2 e SOCS-3 foi demonstrada na PV, e a sua reposição através de terapêuticas génicas, em células progenitoras eritróides, reduziu a hiperproliferação (71). A interação das SOCS com a JAK2V617F poderá também ter um papel importante: além da degradação das SOCS-1 e SOCS-2, a JAK2 mutada é capaz de ultrapassar a regulação negativa das SOCS, ao inibir a degradação da SOCS-3 e promover a sua fosforilação. Deste modo, a SOCS-3 hiperfosforilada além de se tornar incapaz de inibir a JAK2, potencia a ativação da JAK2V617F (72).

Teofili *et al.* (73) demonstraram, em doentes com PV e ET, a desregulação do controlo inibitório das SOCS na via JAK-STAT. A hipermetilação dos genes SOCS-1 e SOCS-3, presente em 33% dos doentes com PV e 25% dos doentes com ET, independentemente da presença de JAK2V617F, associava-se a hematopoiese clonal, sugerindo um papel regulador das SOCS na proliferação celular (73).

Mutações nos Reguladores Epigenéticos

A complexidade inerente à patogênese das MPN's engloba não só alterações genéticas, como também alterações epigenéticas. Nestes processos estão envolvidos três mecanismos principais: a modificação de histonas, a modificação do DNA e o *remodeling* da cromatina.

A modificação de histonas ocorre principalmente através da metilação ou acetilação, mediadas por diversas proteínas, originando alterações nas interações histona-histona e histona-nucleossoma (74,75).

A metilação do DNA ocorre através da adição de um grupo metil a sequências promotoras dinucleotídicas repetitivas citosina-fosfato-guanina (CpG). A metilação de um determinado gene é um fator determinante da sua expressão e é mediada pelas DNA metiltransferases (DNMT). DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pela metilação de citosinas *de novo* e DNMT1 pela manutenção do processo de metilação. A metilação do DNA pode ser revertida através da ação enzimática das proteínas TET (*ten-eleven translocation*), dioxygenases dependentes de ferro e de α -cetoglutarato que impedem a hipermetilação do DNA e desregulação da expressão genética (74,76).

O *remodeling* da cromatina ocorre não apenas pela interação com os restantes mecanismos epigenéticos, mas também pela ação de proteínas reguladoras da cromatina (75).

A interação coordenada destes mecanismos é essencial à expressão genética adequada. A proliferação e diferenciação hematopoiética são alvo de regulação epigenética para expressão ou repressão sequencial de genes específicos, em determinados momentos-chave (77). A alteração destes mecanismos poderá associar-se, desse modo, à desregulação do processo de diferenciação, à patogênese das MPN's e à sua progressão leucêmica (78).

As mutações do gene TET2, localizado no cromossoma 4q24, são eventos recorrentes nas neoplasias hematológicas, ocorrendo em 12 a 13% dos doentes com MPN's e associam-se a transformação leucêmica e pior prognóstico (26,79). Podem, mais frequentemente, preceder a aquisição de outras mutações, como a JAK2V617F, ou surgir após estas mutações, em fases mais tardias (26,79,80). Na sua maioria, estas mutações diminuem a atividade enzimática da TET2 (81). O estudo de diversos modelos animais deficientes em TET2 permitiu observar o seu envolvimento na autorrenovação de HSC's e no compromisso e diferenciação terminal de linhagens, sugerindo aquisição de vantagem proliferativa em relação à TET2 *wild-type* (82–84).

As mutações da DNMT3A associam-se a estados avançados, como a PMF ou a sAML (27,28), apesar de serem alterações que ocorrem precocemente na evolução das MPN's. Surgem, ainda, na presença de outras mutações, como JAK2V617F, IDH1/2 e ASXL1 (79). Em modelos animais com perda de DNMT3A, observa-se simultaneamente o atingimento da capacidade de diferenciação celular das HSC's e a sua expansão (85). Esta mutação parece, através da capacidade de autorrenovação, configurar um fenótipo pré-leucémico e permitir a aquisição de outras mutações com contribuição para transformação leucémica. A observação de disfunções de padrões de metilação diferentes para as doenças mielóides e para as linfóides sugere a existência de mecanismos linhagem-específicos na ação da DNMT3A mutada (86).

Os genes IDH1 e IDH2 codificam as proteínas isocitrato desidrogenase 1 e 2, que catalisam a conversão de isocitrato em α -cetoglutarato. Pardanani *et al.* (30) descreveram a presença de mutações nos genes IDH1/2 em 21% dos doentes com sAML e em 4% dos doentes com PMF. Estão associadas, na PMF, a transformação leucémica e redução da sobrevida (87). A deteção destas mutações na fase crónica das MPN's é mais um dado que sugere que esta mutação possa ser um evento genético precoce, que facilite a transformação leucémica (30). As proteínas IDH1/2 mutadas catalisam, de forma aberrante, a produção de 2-hidroxiglutarato, em vez de α -cetoglutarato, acumulando-se nas células mutantes e resultando na inibição da atividade de enzimas α -cetoglutarato-dependentes, como a TET2. Os padrões de metilação sofrem alterações, com hipermetilação de regiões promotoras (88). A expressão de IDH1/2 mutante ou a depleção de TET2 promovem a expressão de marcadores de superfície celular característicos das HSC's e diminuem a diferenciação mielóide, tendo um efeito proleucemogénico. Estas mutações parecem ser mutuamente exclusivas, evidenciando algum grau de redundância biológica (88).

A EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) é uma proteína metiltransferase, subunidade catalítica do complexo proteico PRC2 (*polycomb repressive complex 2*), responsável por manter o equilíbrio entre o silenciamento e a expressão de genes reguladores da diferenciação e da autorrenovação celular (89). A EZH2 é responsável pela trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27), marcador de repressão translacional (90).

Ainda que tenham sido descritas mutações *gain-of-function* e *loss-of-function* do gene EZH2, localizado no cromossoma 7q36.1, são as mutações com perda de função que se associam às neoplasias mieloproliferativas, nomeadamente, à PMF, à mielofibrose pós-

PV ou pós-ET e à sAML (91–93). As mutações *loss-of-function* resultam numa diminuição da trimetilação H3K27, alterando a cromatina e permitindo a transcrição de genes como os HOX, envolvidos na regulação da autorrenovação das *stem cells*. A diminuição da expressão de EZH2 associa-se ao aumento da expressão de HOXA9, gene envolvido na transformação leucémica (94).

As mutações EZH2 são uma variável independente associada a prognóstico desfavorável em doentes com PMF, com diminuição da sobrevida geral e da sobrevida livre de sAML (93).

O gene ASXL1 (*Additional Sex Combs-like protein-1*), localizado no cromossoma 20q11, codifica uma proteína que se associa a diversos complexos proteicos nos mecanismos de regulação epigenética, como o PR-DUB (*polycomb repressive deubiquitinase complex*) ou o PRC2 (95,96).

As mutações ASXL1 podem anteceder ou suceder outras mutações e ocorrem em 5% das MPN's, sendo mais frequente a sua associação à PMF e à sAML, e mais rara a sua ocorrência na PV e na ET (79,97,98). A sua ocorrência é também comum na mielofibrose pós-ET e pós-PV, sugerindo uma possível utilidade na avaliação do risco de progressão mielofibrótica (99). A presença de mutações ASXL1 está associada a pior prognóstico e diminuição da sobrevida, e a sua associação à mutação CALR em doentes com PMF está associada a atenuação do prognóstico desfavorável (100).

A existência de mutações com perda de função do gene ASXL1 poderá associar-se à diminuição da trimetilação H3K27, por inibição do recrutamento do PRC2/EZH2 nesses locais, originando aumento da expressão dos seus genes-alvo, incluindo os genes HOX (101). A interação de mutações causadoras de disfunção do grupo PRC2, através dos seus componentes EZH2, SUZ12 ou EED, ou da ASXL poderá ser importante para a transformação hematopoiética nas MPN's (101,102).

Mutações em Fatores de Transcrição

Os fatores de transcrição são componentes essenciais na regulação da expressão genética, podendo as mutações de genes que os codificam ter um papel importante na patogénese e progressão das MPN's, tendo particular associação à transformação leucémica das MPN's.

O gene IKZF1 (7p12) codifica para o fator de transcrição *Ikaros*, que se liga a regiões promotoras e regula a expressão de genes-alvo, além de participar no *remodeling* da cromatina (103). Está envolvido na regulação da linfopoiese e da mielopoiese, inibindo a megacariopoiese (104,103,105). É considerado um evento tardio na evolução clonal de MPN's para sAML, pelo que a perda hemizigótica do IKZF1, muitas vezes por deleção do cromossoma 7p, foi observada em 21% dos doentes com sAML e 0,2% das MPN's em fase crónica (104).

A proteína supressora tumoral p53 possui uma variedade de funções biológicas, incluindo o controlo das fases do ciclo celular e a apoptose. As mutações no gene TP53 são comuns e têm um valor prognóstico negativo, associando-se significativamente à sAML (106). Podem, no entanto, estar presentes na fase crónica das MPN's durante vários anos, com cargas alélicas baixas, e, perante a perda do alelo *wild-type* (perda de heterozigotia), resultar uma rápida expansão do clone afetado com dominância clonal e transformação leucémica (79,107,108). A sua importância na progressão da doença é reforçada pela presença de amplificação do locus do gene MDM4, um inibidor da p53, na sAML e não na AML *de novo* (106).

O fator de transcrição RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*) é essencial à regulação da hematopoiese, à maturação dos megacariócitos e produção de plaquetas, e a sua disfunção está envolvida no processo de transformação leucémica (109,110). Antony-Debre *et al.* (111) demonstraram, para mutações do gene RUNX1 com efeito dominante negativo, uma relação entre a carga alélica mutada e o fenótipo, com cargas mais elevadas a resultarem num estado pré-leucémico.

Correlações Genótipo-Fenótipo e Evolução Clonal

As mutações podem ser sistematizadas em dois grupos distintos, existindo, por um lado, mutações *driver*, como a JAK2V617F, a MPLW515 e a CALR, mutuamente exclusivas e determinantes do fenótipo mieloproliferativo. E, por outro, mutações *non-driver* ou cooperativas, que, associadas às mutações *driver*, terão influência na progressão da doença e no seu prognóstico. Neste grupo figuram as mutações TET2, ASXL1, IDH1/2, LNK, EZH2 e TP53, entre outras, associadas a transformação leucémica (4).

Ao contrário de outros tipos de neoplasias, as MPN's apresentam uma grande diversidade fenotípica resultante de um número relativamente reduzido de mutações, espelhando a complexidade inerente às interações entre diferentes alterações genéticas e epigenéticas, e aos fatores que poderão influenciar as relações genótipo-fenótipo, nomeadamente, a carga alélica mutacional, o envolvimento diferencial das vias de sinalização celular, o *background* genético existente e o tipo de células precursoras hematopoiéticas envolvidas.

A expressão genética e a carga alélica das mutações *driver* poderão ter uma contribuição importante para o fenótipo. O aumento gradual da expressão de JAK2 mutante, em modelos transgénicos, altera o fenótipo da doença, de ET-*like* para PV-*like* e, por fim, para PMF-*like* (com níveis mais elevados de expressão genética) (112,113). Estes resultados estão em consonância com a observação de cargas alélicas mutantes mais elevadas em doentes com PV ou PMF (114,115). Passamonti *et al.* (9) descreveram, para a PV, uma relação direta entre a carga alélica e a progressão para mielofibrose, os níveis de hemoglobina e de leucócitos, o tamanho do baço e a celularidade da medula óssea; e uma relação indireta com os níveis de plaquetas. Os parâmetros hematológicos dos doentes com ET e PV JAKV617F-positivas integram um contínuo, em que a carga alélica mutante é o determinante da expressão fenotípica (116), mostrando que ET, PV e PMF poderão representar diferentes fases na evolução das MPN's associadas à JAK2V617F, em vez de diferentes patologias, como primeiro sugerido por Campbell *et al* (117).

A homozigotia para a mutação JAK2V617F, associada a dissomia uniparental adquirida do 9p, implica cargas alélicas mais elevadas e parece ter um papel causal no desenvolvimento de um fenótipo de PV. Associa-se a eritropoiese marcada e contagens plaquetárias inferiores, atribuíveis à diminuição da sobrevivência plaquetária por aumento da apoptose/*clearance* e sugerindo que o aumento da sinalização pela JAK2V617F possa alterar a reatividade plaquetária. Tal facto poderá ser relevante, tendo em conta as

complicações trombóticas/hemorragicas da PV (118). A homozigotia associa-se, inclusivamente, a um *switch* fenotípico de ET para PV, mas poderá ser insuficiente para provocar a expansão clonal ou para a manifestação de fenótipos completos (118,119). A aquisição de outras alterações genéticas ou epigenéticas que permitam a expansão clonal poderá ser a janela de oportunidade para a progressão da doença (120). Existem pequenas populações de subclones homozigóticos em doentes com PV e ET, mas é na PV que ocorre expansão de um subclone dominante devido a uma vantagem seletiva, sugerindo a existência de lesões genéticas ou epigenéticas adicionais (121).

Existe uma grande variabilidade da carga alélica da MPL mutante nas MPN's, estando as cargas mais elevadas fenotipicamente associadas a transformação mielofibrótica, sendo originadas por perdas de heterozigotia adquiridas do cromossoma 1p. Este mecanismo, semelhante ao ocorrido na homozigotia para a mutação JAK2V617F, destaca a frequência com que anomalias mitóticas podem ocorrer em células hematopoiéticas portadoras destas mutações e provocar um *switch* fenotípico quando associadas a diversos mecanismos genéticos e epigenéticos (121,122). Segundo Rumi *et al.* (122), existe uma maior probabilidade de progressão direta de ET associada à MPL para PMF, do que na presença de JAK2V617F, já que a perda de heterozigotia no cromossoma 9p determina primeiro uma progressão para PV e, posteriormente, para PMF.

A análise da carga alélica mutante da CALR, em doentes, revela que esta é inferior à da JAK2V617F, sugerindo uma menor tendência para a recombinação mitótica, aliada à menor frequência reportada de dissomia uniparental no locus CALR (123). A carga alélica mutante origina também uma gradação fenotípica, com fenótipos mais graves associados a cargas alélicas mais elevadas, e havendo uma influência direta da carga alélica nos parâmetros laboratoriais hematológicos. A sobreposição de características clínicas de ET e PMF associadas à CALR sugere um contínuo biológico entre estas entidades, com a determinação do fenótipo pela carga alélica (116,123).

O envolvimento diferencial das vias de sinalização celular poderá influenciar o fenótipo. Na presença da mutação JAK2V617F, estes mecanismos poderão estar na base do desenvolvimento de PV em detrimento de ET: a ativação preferencial da STAT1 promove o desenvolvimento megacariocítico (124). Teofili *et al.* (125) observaram níveis mais elevados de fosforilação de STAT5 e STAT3 em doentes com PV, níveis elevados de fosforilação apenas de STAT3 em doentes com ET e, níveis baixos de fosforilação de ambas em doentes com PMF. A presença de STAT5 é, aliás, segundo Walz *et al.* (126), essencial ao desenvolvimento de um fenótipo de PV.

A presença de fenótipos semelhantes nas diferentes mutações MPLW515 sugere que é a perda do resíduo W515, e não a sua substituição por um outro em particular, a responsável pela sinalização patológica (50). Resíduos citosólicos de tirosina do MPL desempenham funções importantes na sinalização, como o resíduo Y112, essencial à ativação da MAPK, do ERK1/2 e da PI3K, e para o recrutamento e ativação da STAT3, STAT5, entre outras. O sinergismo destas vias de sinalização poderá ser importante para a ativação espontânea do Tpo-R e para a patogénese. A fosforilação do Y112 na MPLW515 parece ser crucial para a proliferação megacariocítica e para o aumento da sinalização pelo Tpo-R no desenvolvimento do fenótipo mielofibrótico (50).

O envolvimento da calreticulina na via JAK-STAT não está ainda esclarecido. Parece existir uma relação entre a mutação CALR e um fenótipo de trombocitose marcada, sugerindo um atingimento primário do desenvolvimento dos megacariócitos (127). A expressão fisiológica preferencial da calreticulina por megacariócitos (128) poderá indiciar mecanismos regulatórios, tendo em conta que a mobilização das reservas de cálcio intracelular é um *trigger* importante da formação de plaquetas e da interação de megacariócitos com o meio extra-celular. Tal ocorre através de mecanismos SOCE (*store operated Ca²⁺ entry*), possivelmente regulados pela calreticulina, permitindo a entrada de cálcio extracelular e a manutenção da motilidade megacariocítica (129,130).

O contexto genético individual poderá influenciar o fenótipo, através de haplótipos de susceptibilidade, porque a mutação JAK2V617F se associa preferencialmente a um haplótipo JAK2 específico, designado 46/1 ou GGCC, representando este um fator de risco para o desenvolvimento de MPN's (131,132); ou através de SNP's (*single-nucleotide polymorphism*) hereditários, dada a associação exclusiva de SNP's nos genes da JAK2 ou do Epo-R à PV (133).

O tipo de células precursoras hematopoiéticas em que ocorre expressão das mutações poderá influenciar o fenótipo da MPN, no entanto, a sua significância é alvo de controvérsia na literatura. A aquisição da mutação JAK2V617F pelas HSC's foi já demonstrada, no entanto, esta associou-se quer à redução do *pool* de HSC's (119), quer à sua expansão (134). Em doentes com PV, James *et al.* (135) observaram a mutação na maioria das HSC's e a sua transmissão a células mais diferenciadas, sendo o processo de diferenciação enviesado para a linhagem eritróide, ao nível das HSC's. Num *pool* de HSC's de doentes com PV, PMF ou MF pós-PV, Jamieson *et al.* (136) demonstraram a presença da mutação em células pluripotentes com capacidade de autorrenovação. Estes autores observaram diferenças significativas entre a PV e a MF na proporção de células portadoras de JAK2V617F e de

células portadoras de *JAK2 wild-type*, ainda que não houvesse alterações significativas quanto à capacidade de autorrenovação e proliferação das células *JAK2V617F*-positivas (136). Outros autores descreveram a ausência de expansão do *pool* de HSC's e de células progenitoras, observando apenas a expansão de células mielóides mais diferenciadas (137). Kent *et al.* (120) reportaram alterações quantitativas e qualitativas ao nível das HSC's, por um lado, com a diminuição do número de HSC's e, por outro, com a diminuição da capacidade de autorrenovação e a existência de viés de diferenciação, sem que houvesse, no entanto, diminuição da capacidade de expansão de células progenitoras.

A aquisição de mutações no gene *MPL* é, à semelhança do ocorrido na *JAK2V617F*, um evento precoce no curso da doença, afetando células progenitoras das linhagens mielóide e linfóide e levando à indução de MPN (138). As mutações *CALR* parecem, de modo semelhante, ser eventos precoces no desenvolvimento das MPN's, estando presentes em células progenitoras capazes de gerar linhagens mielóides e eritróides (25,79).

Ainda que estas não expliquem a diversidade fenotípica existente, as diferentes mutações *driver* parecem estar associadas a fenótipos diferentes. Neste sentido, Rumi *et al.* (116) estudaram as características clínicas da ET, de acordo com a presença de mutações *JAK2* ou *CALR* e em comparação com as características clínicas da PV, observando que havia mais semelhanças entre a ET e a PV *JAK2*-mutadas, do que entre a ET *CALR*-mutada e a ET *JAK2*-mutada: o risco de trombose era superior na presença da *JAK2V617F* ao verificado na ET *CALR*-mutada, além de ter ocorrido progressão de ET para PV numa percentagem significativa destes doentes, o mesmo não se verificando nos doentes com ET *CALR*-mutada (116,123). Estas diferenças levaram os autores a considerar a trombocitemia essencial associada à *CALR* como entidade nosológica distinta da ET e PV *JAK2*-mutadas, afetando indivíduos mais jovens e caracterizada pela presença de trombocitose marcada, mas com risco trombótico relativamente baixo (116). Os doentes com mutações no *MPL*, por seu lado, têm menor incidência de complicações trombóticas e menor risco de evolução leucémica, comparativamente aos doentes com *JAK2*-mutada (122).

As mutações *driver* podem não ser os eventos genéticos inaugurais na evolução clonal das MPN's, sendo, em alguns casos, precedidas por mutações *non-driver*, em reguladores epigenéticos, como o *TET2* ou a *DNMT3A* (79).

A ordem de aquisição das mutações parece influenciar o comportamento das HSC's e das células progenitoras e a sua evolução clonal, além de modificar o risco de trombose e a resposta à terapêutica (139). A presença inicial de *TET2* associa-se a expansão de HSC's e de células progenitoras, mas é apenas a aquisição subsequente da mutação *JAK2V617F* que

origina hiperproliferação de células megacariocíticas e eritróides. Por oposição, na presença inicial de JAK2V617F, as HSC's e as células progenitoras não sofrem expansão até à aquisição da mutação TET2, mas são capazes de gerar um número aumentado de células megacariocíticas e eritróides (139).

Chen *et al.* (140) estudaram a associação da perda homozigótica do gene TET2 à presença de JAK2V617F, e descreveram uma aceleração do fenótipo, com hematopoiese extramedular e esplenomegalia marcadas, e expansão eritromielóide. Estes resultados são consistentes com a hipótese da ocorrência de um efeito sinérgico resultante da dominância clonal originada pelas mutações TET2 e da proliferação clonal resultante da ação da JAK2V617F (140). A vantagem proliferativa subjacente às mutações da TET2 é também sugerida pela sua presença em idosos com hematopoiese clonal associada à idade, sem neoplasias hematológicas (141).

Embora seja consensual o papel central da JAK2V617F no desenvolvimento de uma grande parte das MPN's, a sua presença em indivíduos saudáveis (114) sugere a possibilidade de poder não resultar invariavelmente em doença. Lundberg *et al.* (142) demonstraram a possibilidade de uma única HSC portadora da mutação poder induzir doença, ainda que com baixa eficiência (baixa penetrância e tempo de latência longo).

A presença desta mutação ou de outras mutações *driver* poderá associar-se a um aumento da proliferação, com a geração de um *pool* heterogéneo de células progenitoras, mas não a um aumento da autorrenovação, daí resultando *stress* replicativo. A pressão seletiva para a aquisição de uma vantagem clonal, como a capacidade de autorrenovação, poderá, deste modo, resultar na aquisição de outras mutações, podendo os clones mutados, portadores de vantagem seletiva, ser responsáveis pelo fenótipo (143). A aquisição posterior de mutações *non-driver*, como ASXL, EZH2, CBL ou IDH1/2, poderá contribuir para a progressão da doença e para a transformação leucémica (79).

Tendo em conta a complexidade e a heterogeneidade inerentes às interações entre mutações, a evolução clonal subjacente à instalação e progressão da doença poderá decorrer segundo o modelo da Figura 2.

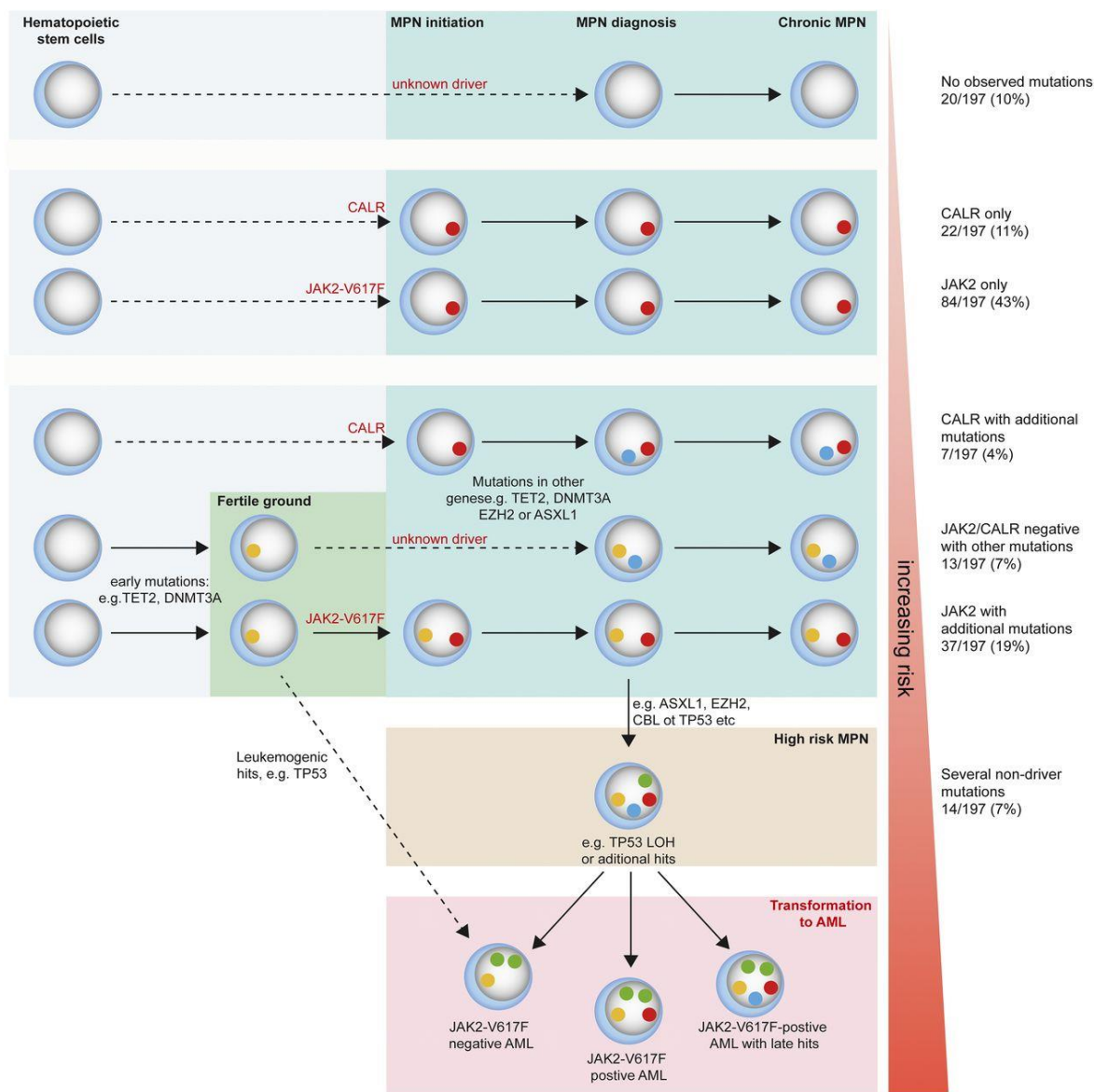


Figura 2 - Modelo de evolução das MPN's e estratificação do risco em correlação com eventos mutacionais.
Fonte: Lundberg et al. (79)

Numa percentagem dos doentes, a presença de uma mutação *driver* nas HSC's poderá motivar expansão e dominância clonal e, consequentemente, progressão da doença para a fase crónica, podendo ou não haver aquisição de mutações adicionais. A existência de mutações inaugurais *non-driver* poderá modificar o ambiente celular do clone neoplásico, determinar vias de sinalização celular distintas como alvo para mutações subsequentes ou alterar a regulação epigenética das HSC's e das células progenitoras (139). A geração heterogénea de subclones poderá levar, por um lado, à instalação e progressão da doença por aquisição de mutações *driver*, ou, por outro, à progressão leucémica, mediante o atingimento de genes como o TP53. Existem ainda os doentes *triple-negative*, que apresentam fenótipo de MPN cuja causa molecular não foi ainda identificada, associados a um prognóstico desfavorável (79,115).

Conclusão

Uma década após a identificação da mutação JAK2V617F, existem, agora, bases mais sólidas, ainda que incompletas, quanto ao conhecimento da patogénese das MPN's, devido à identificação e caracterização de outras mutações associadas e do funcionamento fisiológico dos componentes envolvidos, e ao estudo das relações genótipo-fenótipo. Os modelos explicativos da base patológica das MPN's evoluíram, também, no sentido da maior complexidade, que é hoje por demais evidente nestas patologias, tendo como base os elementos centrais das MPN's, as vias de sinalização intracelular e os seus componentes e, mais recentemente, envolvendo também reguladores epigenéticos e da transcrição.

A mudança de paradigma ocorreu com o abandono do conceito de patologias causadas por uma única mutação e com a integração de mutações recém-descobertas num contexto de evolução clonal e o reconhecimento da sua contribuição para a patogénese, através do seu estudo em modelos animais, em doentes e até na população.

A sistematização das alterações genéticas e epigenéticas em mutações *driver* e *non-driver*, ainda que simplista, permite a compreensão dos modelos explicativos para a evolução clonal das MPN's e a influência de fatores como a carga alélica mutante, o *background* genético do doente, o envolvimento diferencial das vias de sinalização celular e a ordem das mutações, como determinantes fenotípicos.

A alteração genética mais frequente, a mutação JAK2V617F, parece dar origem a um contínuo biológico determinado pela sua carga alélica, com ET, PV e PMF a representarem várias fases de uma mesma entidade patológica. As diferenças fenotípicas observadas na ET e na PMF, em doentes com JAK2V617F e em doentes com CALR, reforçam esta hipótese. Além do mais, parece existir um padrão semelhante de gradação fenotípica observado em doentes com mutações da CALR. Por um lado, a progressão mielofibrótica associa-se à carga alélica mutante, resultando da perda de heterozigotia das mutações JAK2V617F e MPLW515. Por outro, a progressão leucémica associa-se à aquisição de mutações adicionais em genes de fatores de transcrição ou reguladores epigenéticos com contribuição para diferenciação e proliferação celular.

A crescente clarificação da base genética e epigenética das MPN's, das correlações genótipo-fenótipo e do valor prognóstico destas mutações poderá permitir uma melhor compreensão da sua evolução clonal. Possibilitará também utilização das mutações para diagnosticar e estadiar a doença, prever a sua progressão, e permitir a criação de terapêuticas-

alvo mais eficazes centradas no padrão molecular presente, tendo em conta as implicações, muitas vezes subtis das mutações nas vias de sinalização celular.

Referências Bibliográficas

1. World Health Organization, Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer, editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. ed. Lyon: Internat. Agency for Research on Cancer; 2008. 439 p.
2. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: Order out of chaos. *Cancer*. 2009 Sep 1;115(17):3842–7.
3. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951 Apr;6(4):372–5.
4. Tefferi A, Pardanani A. Myeloproliferative Neoplasms: A Contemporary Review. *JAMA Oncol*. 2015 Apr 1;1(1):97.
5. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014 Oct 16;124(16):2507–13.
6. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Aug 10;29(23):3179–84.
7. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1874–81.
8. Huang J, Li C-Y, Mesa RA, Wu W, Hanson CA, Pardanani A, et al. Risk factors for leukemic transformation in patients with primary myelofibrosis. *Cancer*. 2008 Jun 15;112(12):2726–32.
9. Passamonti F, Thiele J, Girodon F, Rumi E, Carobbio A, Gisslinger H, et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2012 Aug 9;120(6):1197–201.
10. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count,

- and transfusion status. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Feb 1;29(4):392–7.
11. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960 Jul;25:85–109.
 12. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973 Jun 1;243(5405):290–3.
 13. Canaani E, Steiner-Saltz D, Aghai E, Gale RP, Berrebi A, Januszewicz E. Altered Transcription Of An Oncogene In Chronic Myeloid Leukaemia. *The Lancet*. 1985;323(8377):593–5.
 14. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature*. 1985 Jun 27;315(6022):758–61.
 15. Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967;58(4):1468–71.
 16. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med*. 1976 Oct 21;295(17):913–6.
 17. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*. 1978 Feb;51(2):189–94.
 18. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood*. 1981 Nov;58(5):916–9.
 19. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 Mar 19;365(9464):1054–61.
 20. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144–8.
 21. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779–90.

22. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 Apr;7(4):387–97.
23. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006 Jul;3(7):e270.
24. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2379–90.
25. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2391–405.
26. Delhommeau F, Dupont S, Valle VD, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289–301.
27. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, Lasho TL, Levine RL, Tefferi A. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011 Jul;25(7):1219–20.
28. Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, Paschka P, Griesshammer M, Bliersch C, et al. DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011 Jul;25(7):1217–9.
29. Green A, Beer P. Somatic Mutations of IDH1 and IDH2 in the Leukemic Transformation of Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2010 Jan 28;362(4):369–70.
30. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Mai M, McClure RF, Tefferi A. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010 Jun;24(6):1146–51.
31. Kralovics R, Guan Y, Prechal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002;30(3):229–36.
32. Silvennoinen O, Ungureanu D, Niranjana Y, Hammaren H, Bandaranayake R, Hubbard SR. New insights into the structure and function of the pseudokinase domain in JAK2. *Biochem Soc Trans*. 2013 Aug 1;41(4):1002–7.

33. Saharinen P, Silvennoinen O. The Pseudokinase Domain Is Required for Suppression of Basal Activity of Jak2 and Jak3 Tyrosine Kinases and for Cytokine-inducible Activation of Signal Transduction. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47954–63.
34. Funakoshi-Tago M, Pelletier S, Moritake H, Parganas E, Ihle JN. Jak2 FERM Domain Interaction with the Erythropoietin Receptor Regulates Jak2 Kinase Activity. *Mol Cell Biol*. 2008 Mar 1;28(5):1792–801.
35. Gorantla SP, Dechow TN, Grundler R, Illert AL, Zum Büschenfelde CM, Kremer M, et al. Oncogenic JAK2V617F requires an intact SH2-like domain for constitutive activation and induction of a myeloproliferative disease in mice. *Blood*. 2010 Nov 25;116(22):4600–11.
36. Jatiani SS, Baker SJ, Silverman LR, Reddy EP. JAK/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders approaches for targeted therapies. *Genes Cancer*. 2010;1(10):979–93.
37. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Aug 18;118(7):1723–35.
38. Staerk J, Constantinescu SN. The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective. *JAK-STAT*. 2012 Jul;1(3):184–90.
39. Them NCC, Kralovics R. Genetic basis of MPN: Beyond JAK2-V617F. *Curr Hematol Malig Rep*. 2013 Dec;8(4):299–306.
40. Dawson MA, Bannister AJ, Göttgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 α from chromatin. *Nature*. 2009 Oct 8;461(7265):819–22.
41. Liu F, Zhao X, Perna F, Wang L, Koppikar P, Abdel-Wahab O, et al. JAK2V617F-Mediated Phosphorylation of PRMT5 Downregulates Its Methyltransferase Activity and Promotes Myeloproliferation. *Cancer Cell*. 2011 Feb;19(2):283–94.
42. Lu X, Huang LJ-S, Lodish HF. Dimerization by a cytokine receptor is necessary for constitutive activation of JAK2V617F. *J Biol Chem*. 2008 Feb 29;283(9):5258–66.
43. Milosevic JD, Kralovics R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *Int J Hematol*. 2013 Feb;97(2):183–97.
44. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007 Feb 1;356(5):459–68.

45. Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: A comprehensive review. *Am J Hematol*. 2011 Aug;86(8):668–76.
46. Tefferi A. JAK and MPL mutations in myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2008 Jan;49(3):388–97.
47. Pietra D, Brisci A, Rumi E, Boggi S, Elena C, Pietrelli A, et al. Deep sequencing reveals double mutations in cis of MPL exon 10 in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2011 Apr 1;96(4):607–11.
48. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Beelen D, Bojko P, Burkle D, et al. Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica*. 2009 Jan 1;94(1):141–4.
49. Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):1864–71.
50. Pecquet C, Staerk J, Chaligne R, Goss V, Lee KA, Zhang X, et al. Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. *Blood*. 2010 Feb 4;115(5):1037–48.
51. Defour J-P, Itaya M, Gryshkova V, Brett IC, Pecquet C, Sato T, et al. Tryptophan at the transmembrane-cytosolic junction modulates thrombopoietin receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci*. 2013 Feb 12;110(7):2540–5.
52. Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor S-M, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J*. 2010 Mar 1;24(3):665–83.
53. Broseus J, Park J-H, Carillo S, Hermouet S, Girodon F. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. *Blood*. 2014 Dec 18;124(26):3964–6.
54. Rudd CE. Lnk Adaptor: Novel Negative Regulator of B Cell Lymphopoiesis. *Sci Signal*. 2001 Jun 5;2001(85):pe1–pe1.
55. Seita J, Ema H, Ooehara J, Yamazaki S, Tadokoro Y, Yamasaki A, et al. Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Feb 13;104(7):2349–54.

56. Gery S, Cao Q, Gueller S, Xing H, Tefferi A, Koeffler HP. Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J Leukoc Biol.* 2009 Jun 1;85(6):957–65.
57. Baran-Marszak F, Magdoud H, Desterke C, Alvarado A, Roger C, Harel S, et al. Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2010 Dec 23;116(26):5961–71.
58. Bersenev A, Wu C, Balcerek J, Jing J, Kundu M, Blobel GA, et al. Lnk constrains myeloproliferative diseases in mice. *J Clin Invest.* 2010 Jun 1;120(6):2058–69.
59. Takaki S. Enhanced Hematopoiesis by Hematopoietic Progenitor Cells Lacking Intracellular Adaptor Protein, Lnk. *J Exp Med.* 2002 Jan 14;195(2):151–60.
60. Suzuki N, Yamazaki S, Ema H, Yamaguchi T, Nakauchi H, Takaki S. Homeostasis of hematopoietic stem cells regulated by the myeloproliferative disease associated-gene product Lnk/Sh2b3 via Bcl-xL. *Exp Hematol.* 2012 Feb;40(2):166–74.e3.
61. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2010 Aug 12;116(6):988–92.
62. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia.* 2010 Oct;24(10):1713–8.
63. Swaminathan G, Tsygankov AY. The Cbl family proteins: Ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol.* 2006 Oct;209(1):21–43.
64. Saur SJ, Sangkhae V, Geddis AE, Kaushansky K, Hitchcock IS. Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood.* 2010 Feb 11;115(6):1254–63.
65. Rathinam C, Thien CBF, Langdon WY, Gu H, Flavell RA. The E3 ubiquitin ligase c-Cbl restricts development and functions of hematopoietic stem cells. *Genes Dev.* 2008 Mar 26;22(8):992–7.
66. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2009 Jun 11;113(24):6182–92.
67. Sanada M, Suzuki T, Shih L-Y, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, et al. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature.* 2009 Aug 13;460(7257):904–8.

68. Schmidt MHH, Dikic I. The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Dec;6(12):907–18.
69. Ogawa S, Shih L-Y, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koefler HP, et al. Deregulated Intracellular Signaling by Mutated c-CBL in Myeloid Neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2010 Aug 1;16(15):3825–31.
70. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jun;7(6):454–65.
71. Usenko T, Eskinazi D, Correa PN, Amato D, Ben-David Y, Axelrad AA. Overexpression of SOCS-2 and SOCS-3 genes reverses erythroid overgrowth and IGF-I hypersensitivity of primary polycythemia vera (PV) cells. *Leuk Lymphoma.* 2007 Jan;48(1):134–46.
72. Hookham MB, Elliott J, Suessmuth Y, Staerk J, Ward AC, Vainchenker W, et al. The myeloproliferative disorder associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood.* 2007 Jun 1;109(11):4924–9.
73. Teofili L, Martini M, Cenci T, Guidi F, Torti L, Giona F, et al. Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases. *Int J Cancer.* 2008 Oct 1;123(7):1586–92.
74. Mascarenhas J, Roper N, Chaurasia P, Hoffman R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. *Clin Epigenetics.* 2011 Aug;2(2):197–212.
75. Brookes E, Shi Y. Diverse Epigenetic Mechanisms of Human Disease. *Annu Rev Genet.* 2014 Nov 23;48(1):237–68.
76. Williams K, Christensen J, Helin K. DNA methylation: TET proteins—guardians of CpG islands? *EMBO Rep.* 2011 Dec 9;13(1):28–35.
77. Ji H, Ehrlich LIR, Seita J, Murakami P, Doi A, Lindau P, et al. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature.* 2010 Sep 16;467(7313):338–42.
78. Perez C, Pascual M, Martin-Subero JI, Bellosillo B, Segura V, Delabesse E, et al. Aberrant DNA methylation profile of chronic and transformed classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* 2013 Sep 1;98(9):1414–20.
79. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2014 Apr 3;123(14):2220–8.

80. Schaub FX, Looser R, Li S, Hao-Shen H, Lehmann T, Tichelli A, et al. Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010 Mar 11;115(10):2003–7.
81. Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*. 2014 Mar;28(3):485–96.
82. Ko M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Thompson EC, Hastie R, et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Aug 30;108(35):14566–71.
83. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, et al. Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation. *Cancer Cell*. 2011 Jul;20(1):11–24.
84. Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O, et al. TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis. *Cancer Cell*. 2011 Jul;20(1):25–38.
85. Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*. 2011 Dec 4;44(1):23–31.
86. Mayle A, Yang L, Rodriguez B, Zhou T, Chang E, Curry CV, et al. Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation. *Blood*. 2015 Jan 22;125(4):629–38.
87. Tefferi A, Jimma T, Sulai NH, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, et al. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):475–80.
88. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010 Dec 14;18(6):553–67.
89. Lund K, Adams PD, Copland M. EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):44–9.
90. Völkel P, Angrand P-O. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*. 2007 Jan;89(1):1–20.

91. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myeloid disorders. *Nat Genet.* 2010 Aug;42(8):722–6.
92. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, et al. Concomitant analysis of *EZH2* and *ASXL1* mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2011 Jul;25(7):1200–2.
93. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M, et al. *EZH2* mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood.* 2011 Nov 10;118(19):5227–34.
94. Khan SN, Jankowska AM, Mahfouz R, Dunbar AJ, Sugimoto Y, Hosono N, et al. Multiple mechanisms deregulate *EZH2* and histone H3 lysine 27 epigenetic changes in myeloid malignancies. *Leukemia.* 2013 Jun;27(6):1301–9.
95. Carbuccion N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adélaïde J, Rey J, et al. Mutations of *ASXL1* gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2009 Nov;23(11):2183–6.
96. Katoh M. Functional and cancer genomics of *ASXL* family members. *Br J Cancer.* 2013 Jul 23;109(2):299–306.
97. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, et al. Genetic Analysis of Transforming Events That Convert Chronic Myeloproliferative Neoplasms to Leukemias. *Cancer Res.* 2010 Jan 15;70(2):447–52.
98. Stein BL, Williams DM, O’Keefe C, Rogers O, Ingersoll RG, Spivak JL, et al. Disruption of the *ASXL1* gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. *Haematologica.* 2011 Oct 1;96(10):1462–9.
99. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccion N, et al. Mutation analysis of *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *MPL*, *NF1*, *SF3B1*, *SUZ12*, and *TET2* in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012 Aug;51(8):743–55.
100. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Finke C, Mannarelli C, et al. *CALR* and *ASXL1* mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia.* 2014 Jul;28(7):1494–500.

101. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, et al. ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell*. 2012 Aug;22(2):180–93.
102. Score J, Hidalgo-Curtis C, Jones AV, Winkelmann N, Skinner A, Ward D, et al. Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2012 Feb 2;119(5):1208–13.
103. Francis OL. Regulator of myeloid differentiation and function: The secret life of Ikaros. *World J Biol Chem*. 2011;2(6):119.
104. Jäger R, Gisslinger H, Passamonti F, Rumi E, Berg T, Gisslinger B, et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010 Jul;24(7):1290–8.
105. Malinge S, Thiollier C, Chlon TM, Dore LC, Diebold L, Bluteau O, et al. Ikaros inhibits megakaryopoiesis through functional interaction with GATA-1 and NOTCH signaling. *Blood*. 2013 Mar 28;121(13):2440–51.
106. Milosevic JD, Puda A, Malcovati L, Berg T, Hofbauer M, Stukalov A, et al. Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2012 Nov;87(11):1010–6.
107. Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. p53 Lesions in Leukemic Transformation. *N Engl J Med*. 2011 Feb 3;364(5):488–90.
108. Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahab O, Nahas M, Wang K, Lipson D, et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Dec 16;111(50):E5401–10.
109. Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A, Harada H. AML1/RUNX1 point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009 Dec 10;114(25):5201–5.
110. Ichikawa M, Yoshimi A, Nakagawa M, Nishimoto N, Watanabe-Okochi N, Kurokawa M. A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2013 Jun;97(6):726–34.
111. Antony-Debre I, Manchev VT, Balayn N, Bluteau D, Tomowiak C, Legrand C, et al. Level of RUNX1 activity is critical for leukemic predisposition but not for thrombocytopenia. *Blood*. 2015 Feb 5;125(6):930–40.
112. Lacout C. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006 May 9;108(5):1652–60.

113. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*. 2008 Jan 11;111(8):3931–40.
114. Nielsen C, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Kofoed KF, Birgens HS. JAK2V617F somatic mutation in the general population: myeloproliferative neoplasm development and progression rate. *Haematologica*. 2014 Sep 1;99(9):1448–55.
115. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martinez-Trillos A, Casetti I, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014 Aug 14;124(7):1062–9.
116. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123(10):1544–51.
117. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005 Dec 3;366(9501):1945–53.
118. Li J, Kent DG, Godfrey AL, Manning H, Nangalia J, Aziz A, et al. JAK2V617F homozygosity drives a phenotypic switch in myeloproliferative neoplasms, but is insufficient to sustain disease. *Blood*. 2014 May 15;123(20):3139–51.
119. Li J, Kent DG, Chen E, Green AR. Mouse models of myeloproliferative neoplasms: JAK of all grades. *Dis Model Mech*. 2011 May 1;4(3):311–7.
120. Kent DG, Li J, Tanna H, Fink J, Kirschner K, Pask DC, et al. Self-Renewal of Single Mouse Hematopoietic Stem Cells Is Reduced by JAK2V617F Without Compromising Progenitor Cell Expansion. Goodell MA, editor. *PLoS Biol*. 2013 Jun 4;11(6):e1001576.
121. Godfrey AL, Chen E, Pagano F, Ortmann CA, Silber Y, Bellosillo B, et al. JAK2V617F homozygosity arises commonly and recurrently in PV and ET, but PV is characterized by expansion of a dominant homozygous subclone. *Blood*. 2012 Sep 27;120(13):2704–7.
122. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, Bordoni R, Casetti I, Milanesi C, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2013 May 23;121(21):4388–95.

123. Andrikovics H, Krahling T, Balassa K, Halm G, Bors A, Koszarska M, et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica*. 2014 Jul 1;99(7):1184–90.
124. Chen E, Beer PA, Godfrey AL, Ortmann CA, Li J, Costa-Pereira AP, et al. Distinct Clinical Phenotypes Associated with JAK2V617F Reflect Differential STAT1 Signaling. *Cancer Cell*. 2010 Nov;18(5):524–35.
125. Teofili L, Martini M, Cenci T, Petrucci G, Torti L, Storti S, et al. Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK-2 mutation. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):354–9.
126. Walz C, Ahmed W, Lazarides K, Betancur M, Patel N, Hennighausen L, et al. Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2V617F in mice. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3550–60.
127. Cazzola M, Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014 Jun 12;123(24):3714–9.
128. Vannucchi AM, Rotunno G, Bartalucci N, Raugei G, Carrai V, Balliu M, et al. Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. *Leukemia*. 2014 Sep;28(9):1811–8.
129. Andrea Di Buduo C, Moccia F, Battiston M, De Marco L, Mazzucato M, Moratti R, et al. The importance of calcium in the regulation of megakaryocyte function. *Haematologica*. 2014 Apr 1;99(4):769–78.
130. Malara A, Abbonante V, Di Buduo CA, Tozzi L, Currao M, Balduini A. The secret life of a megakaryocyte: emerging roles in bone marrow homeostasis control. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Apr;72(8):1517–36.
131. Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009 Mar 15;41(4):446–9.
132. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009 Apr;41(4):450–4.
133. Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2785–9.

134. Akada H, Yan D, Zou H, Fiering S, Hutchison RE, Mohi MG. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood*. 2010 Apr 29;115(17):3589–97.
135. Jamieson CHM, Gotlib J, Durocher JA, Chao MP, Mariappan MR, Lay M, et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Apr 18;103(16):6224–9.
136. James C, Mazurier F, Dupont S, Chaligne R, Lamrissi-Garcia I, Tulliez M, et al. The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2429–38.
137. Anand S, Stedham F, Beer P, Gudgin E, Ortmann CA, Bench A, et al. Effects of the JAK2 mutation on the hematopoietic stem and progenitor compartment in human myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Jul 7;118(1):177–81.
138. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Mesa RA, Hogan WJ, Ketterling RP, et al. Extending Jak2V617F and MplW515 Mutation Analysis to Single Hematopoietic Colonies and B and T Lymphocytes. *STEM CELLS*. 2007 Sep;25(9):2358–62.
139. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, et al. Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2015 Feb 12;372(7):601–12.
140. Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ, Rosen EA, Poveromo L, Elf S, et al. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2015 Jan 8;125(2):327–35.
141. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet*. 2012 Sep 23;44(11):1179–81.
142. Lundberg P, Takizawa H, Kubovcakova L, Guo G, Hao-Shen H, Dirnhofer S, et al. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *J Exp Med*. 2014 Oct 20;211(11):2213–30.
143. Prick J, de Haan G, Green AR, Kent DG. Clonal heterogeneity as a driver of disease variability in the evolution of myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol*. 2014 Oct;42(10):841–51.